

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>5</sup> :</b> <b>C12N 15/00, A61K 39/395</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 90/01543 <b>(43) Date de publication internationale:</b> 22 février 1990 (22.02.90)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/CH89/00141 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 28 juillet 1989 (28.07.89) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 88/10334 29 juillet 1988 (29.07.88) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INTRACEL CORPORATION [BB/BB]; Cottle Catford & Co., 17 High Street, Bridgetown (BB). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> FISCHBACH, Michel [LU/FR]; Co Fidanza Gerome, 84, rue de la Vanoise, F-70100 Gray (FR). DIEZ IBANEZ, Miguel [ES/FR]; 16 bis, rue de Fontaine, F-21000 Dijon (FR). CAO, Hanwei [CN/FR]; 16, rue de Huches, F-21800 Quétigny (FR). DREANO, Michel [FR/FR]; 330, route de Genève, F-74160 Collonges-sous-Salève (FR). TSACONAS, Christos [GR/FR]; 6, rue Jehan-de-Vienne, F-21800 Chevilly-Saint-Sauveur (FR). MONTANDON, Frederic [FR/FR];		<b>(3) route de Mercy, F-89210 Brienon-sur-Armençon (FR). BROMLEY, Peter [GB/CH]; 37, crêts de la Neige, CH-1234 Vessy (CH). PADIEU, Prudent [FR/FR]; 8, rue du Colonel-Marchand, F-21000 Dijon (FR).</b> <b>(74) Mandataire:</b> MICHELI & CIE; Case postale 47, CH-1211 Genève 6 (CH). <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR THE GENETIC EXPRESSION OF HETEROLOGOUS PROTEINS BY CELLS TRANSFECTED IN VIVO		
<b>(54) Titre:</b> PROCEDE D'EXPRESSION GENETIQUE DE PROTEINES HETEROLOGUES PAR DES CELLULES TRANSFECTEES IN VIVO		
<b>(57) Abstract</b> <p>The method disclosed is used for the genetic expression in vivo of heterologous proteins such as the c-ras oncogene of Harvey, the human growth hormone gene (hGH) and the gene resisting to neomycine by means of cells transfected with liposome that is injected as a suspension in the blood circulating in an animal (rat or rabbit). The expression vector encapsulated in the liposomes injected may contain for example the gene coding for an oncogene. In this case, a member containing transfected differentiated cells is taken from the animal and they are then cultivated in vitro in order to select the cells which express the oncogene and which, consequently, may proliferate in vitro. When the animal is injected with liposomes encapsulating the gene of hGH and the neomycine resistant gene, the cells selected in culture media containing the antibiotic produce hGH. On the other hand, when the expression vector contains the gene of hGH controlled by the human promotor of the 70 kd, thermal shock protein gene, and it is injected to animals, the latter secrete in the circulating blood hGH after thermal induction. Furthermore the repetition of these steps induces the synthesis of anti-hGH antibodies by the animal. The main fields of application of the invention are either the production of differentiated cells capable of proliferating in vitro or the production in vivo of biologically active or antigenic heterologous proteins.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

18472  
#79

(57) Abrégé

Le procédé décrit sert à l'expression génétique in vivo de protéines hétérologues telles que l'oncogène c-ras de Harvey, le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) et le gène de résistance à la néomycine par des cellules transfectées à l'aide de liposome que l'on injecte en suspension dans le sang circulant d'un animal (rat ou lapin). Le vecteur d'expression encapsulé dans les liposomes injectés peut contenir par exemple le gène codant pour un oncogène. Dans ce cas, on prélève de l'animal un organe contenant des cellules différenciées transfectées que l'on remet en culture in vitro afin de sélectionner les cellules qui expriment l'oncogène et qui par conséquent peuvent proliférer in vitro. Lorsque l'animal est injecté avec des liposomes encapsulant le gène de l'hGH et le gène de résistance à la néomycine, les cellules sélectionnées dans des milieux de culture contenant l'antibiotique, produisent l'hGH. D'autre part, lorsque le vecteur d'expression contient le gène de l'hGH sous contrôle du promoteur humain du gène de la protéine de choc thermique de 70 kd, est injecté aux animaux, ceux-ci sécrètent dans le sang circulant, de l'hGH après induction thermique. De plus, la répétition de ces étapes induit la synthèse d'anticorps anti-hGH par l'animal. Les domaines principaux d'application de l'invention sont soit de produire des cellules différenciées capables de proliférer in vitro, soit la production in vivo de protéines hétérologues biologiquement actives ou antigéniques.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brazili	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

## **Procédé d'expression génétique de protéines hétérologues par des cellules transfectées in vivo**

### **Domaine technique**

L'invention a pour objet un procédé d'expression génétique de protéines hétérologues transfectées par des cellules in vivo à l'aide d'au moins un vecteur d'expression de gène encapsulé dans des liposomes, selon lequel on prépare une suspension de liposomes dans lesquels le vecteur d'expression est encapsulé et l'on injecte cette suspension de liposomes dans le sang circulant d'un animal.

Le procédé selon l'invention est prévu, d'une part, pour produire un oncogène capable d'immortaliser des cellules différenciées et de proliférer in vitro ainsi que de produire des protéines d'intérêt industriel.

Le procédé selon l'invention est prévu, d'autre part, pour produire in vivo au moins une protéine hétérologue par les cellules de l'animal "transfecté", ainsi que des anticorps dirigés contre cette protéine.

### **Technique antérieure**

L'état de la technique relative à l'expression génétique de protéines hétérologues par des cellules transfectées in vivo à l'aide de vecteurs d'expression de gène encapsulés dans des liposomes, peut être illustré par les publications citées ci-après à titre d'exemple.

Selon EP-A1-0 027 662, on a réalisé la synthèse d'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBs) dans le foie de lapins injectés avec ces liposomes encapsulant le gène de l'HBs.

Selon le brevet US-A-4 394 448, on a injecté dans des souris Balb/c qui ne produisent pas de protéine urinaire 2 (mup2), des liposomes encapsulant de l'ADN de souris non-fractionné et on a retrouvé de la mup2 dans l'urine de ces animaux.

Dans l'article de Nandi et al., 1986, J. Biol. Chem. 261, 16722-16726, on a décrit l'encapsulation du gène de la préproinsuline I de rat et, après injection chez le rat, la synthèse d'insuline.

L'ensemble des résultats présentés dans les publications ci-dessus montrent qu'une information génétique véhiculée par les liposomes dans un animal peut entraîner la synthèse de protéines hétérologues dans un animal "transfecté".

#### Exposé de l'invention

Le but de la présente invention est de permettre l'expression génétique de protéines hétérologues par des cellules transfectées *in vivo* à l'aide d'au moins un vecteur d'expression d'un gène encapsulé dans des liposomes, de manière à permettre la synthèse de diverses protéines en quantité adéquate pour leurs applications pratiques.

A cette fin, l'invention a pour objet un procédé d'expression génétique tel que défini dans les revendications.

Lors de la mise en oeuvre de la présente invention, on a introduit dans des rats les séquences oncogéniques du gène cellulaire *ras* de Harvey (tel que décrit par Tabin et al., 1982, *Nature* 300, 143-149) et le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) sous contrôle du promoteur de la protéine du gène de la protéine de choc thermique de 70.000 d (hsp70 pour "heat shock protein 70 kd") (tel que décrit par Dreano et al., 1988, *Bio/Technology* 6, 953-958).

L'expression de ces gènes a été retrouvée dans les hépatocytes de ces animaux après les avoir remis en culture *in vitro*. En effet, ils se sont avérés capables et de proliférer *in vitro* et de produire, après induction par la chaleur, de l'hGH.

On a, en outre, introduit deux plasmides (p17hGHneo et p17HBN, tels que décrit par Dreano et al., 1988, *Bio/Technology* 6, 953-958) contenant le gène hybride hsp70-hGH, dans des rats et dans des lapins (dans le cas du p17hGHneo). On a retrouvé dans le sang circulant de ces animaux soit de l'hGH soit des anticorps anti-hGH.

Les avantages de l'utilisation de gènes exprimés sous une induction contrôlée, par le promoteur des gènes des hsp, pour la production de protéines hétérologues par des cellules en culture a été amplement décrit

(notamment par Nover, 1987, *Enz. Microb. Technol.* 9, 129-144).

Dans la présente invention, on a utilisé le promoteur du gène de la hsp70. Il constitue un promoteur particulièrement puissant, et il est exprimé dans la quasi totalité des cellules eucaryotes lorsque celles ci sont soumises à un choc thermique et permet ainsi de contrôler ainsi le processus d'expression des gènes qu'il dirige.

Il est particulièrement important dans le cas de la transfection in vivo, conformément à la présente invention, d'obtenir la meilleure expression possible, de façon contrôlée, afin de pouvoir programmer l'expression et de mimer ainsi les conditions d'immunisation classiques utilisant un antigène purifié. De même, il est d'un grand intérêt pratique de pouvoir étendre le champs d'application du procédé selon l'invention au plus grand nombre de types de cellules productrices.

La transfection in vivo permet d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre toute sorte de protéines sécrétées (ou trans-membranaire) ainsi que leurs variants génétiques sans aucune production in vitro de l'antigène ni de lignées cellulaires le produisant.

Les dessins annexés illustrent des résultats obtenus dans deux exemples de la mise en oeuvre de l'invention décrite ci-après.

#### Description sommaire des dessins

Figure 1 est une autoradiographie obtenue dans un exemple de la mise en oeuvre de l'invention.

Figure 2 est une autoradiographie obtenue dans un autre exemple de la mise en oeuvre de l'invention.

#### Manière de réaliser l'invention

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants:

##### Exemple 1

On a réalisé la transfection in vivo d'hépatocytes de rat par des liposomes encapsulant des vecteurs d'expression, et obtenu la synthèse consécutive in vitro des gènes recombinés de la manière décrite ci-dessous.

### 1. Vecteurs d'expression utilisés:

- Le plasmide pEJ contenant l'oncogène cellulaire ras de Harvey sous sa forme mutée, isolé chez l'homme par Tabin et al., 1982, Nature 300, 143-149.
- Le plasmide p17hGHneo (Dreano et al., 1986, Gene 49, 1-8) contenant le gène de résistance à la néomycine sous contrôle des séquences régulatrices du Virus Simien 40 (SV40) et le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) dirigé par le promoteur humain du gène de la hsp70. L'avantage de l'utilisation de gènes exprimés sous une induction contrôlée, par le promoteur du gène des protéines de choc thermique, pour la production de protéines hétérologues dans une variété de cellules en culture a été amplement décrit par Nover, 1987, Enz. Microb. Technol., 9, 129-144.
- Le plasmide p17HBN contenant le même gène hybride hsp70-hGH, un gène de résistance à la néomycine dirigé par les séquences régulatrices du gène de la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex 1 et un fragment subgénomique transformant du virus du papillome bovin (Dreano et al., 1988, Bio/Technology 6, 953-958).

### 2. Transfection:

2.1 Des liposomes monolamellaires ont été préparés, selon la méthode de Deamer et al., 1976, Biochem. Biophys. Acta 433, 629-634, à partir de 2 mg de phosphatidylcholine dissous dans 1 ml de chloroforme et repris, après évaporation, dans 1 ml d'éther diéthylique. La suspension finale de liposomes est réalisée dans 1 ml de milieu de culture synthétique de base complet mais sans sérum, contenant 100 µg d'ADN de plasmide p17hGHneo et pEJ. Cette solution est débarrassée de l'éther diéthylique par un bullage d'air-CO<sub>2</sub> (95:5, v/v), à 20°C, tout en équilibrant le milieu au pH physiologique par un système tampon, en vue de l'injection.

2.2 Cette suspension de liposomes encapsulant les plasmides a été injectée dans la veine caudale d'un rat Fisher F-344 de huit semaines, à raison de 1 ml en 30 secondes. Ceci correspond à une injection intraveineuse de 100µg d'ADN de plasmide.

2.3 Cette injection a été répétée deux fois, à huit jours d'intervalle, (ou autant de fois et selon un rythme reconnu comme nécessaire pour observer

une transfection de cellules de l'organe concerné).

2.4 Le lendemain de la dernière injection, on a sacrifié l'animal et isolé les hépatocytes par perfusion à la collagénase (Williams et al., 1977, *In Vitro* 13, 808-817).

Le milieu de culture utilisé était le milieu WME (Williams et al., 1974, *Exp. Cell. Res.* 89, 139-142) contenant 10% de sérum de veau foetal ainsi que de l'insuline et du cortisol. Après 28 h de culture, les cellules ont été entretenues avec du milieu WME additionné de 2% d'Ultrosor G® (LKB) qui est un substitut de sérum. Il contient, d'une façon standardisée, des protéines dont de l'albumine et de la transferrine, des acides gras indispensables, des facteurs de croissance dont l'EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi que des hormones dont l'insuline et la dexaméthasone. Ce substitut a été choisi pour ses apports constants en facteurs de croissance et en hormones.

Un essai a été effectué en parallèle sur un rat témoin, en utilisant des liposomes produits en l'absence de plasmides.

### 3. Résultats:

#### 3.1 Prolifération des hépatocytes:

Pendant les deux premiers jours de culture, aucune différence du point de vue de la morphologie cellulaire n'a pu être détectée au microscope optique entre les deux préparations d'hépatocytes provenant, d'une part, du rat ayant reçu des liposomes encapsulant des plasmides et, d'autre part, du rat ayant reçu des liposomes sans plasmides. Les jours suivants des dômes de cellules mitotiques ont commencé à apparaître dans les cultures provenant du foie du rat ayant reçu des injections de liposomes encapsulant les plasmides. Ces cellules de forme arrondie se sont détachées d'une façon continue du tapis d'hépatocytes pour former des grappes de cellules poussant en suspension. Après 25 jours de culture, il ne restait plus de plages d'hépatocytes dans les flacons de la culture primaire d'hépatocytes du rat témoin, alors que dans la culture provenant du rat traité par les liposomes encapsulant les plasmides, la couche cellulaire était restée intacte. Ceci a été observé pendant plus de 75 jours.

Ces cellules ont gardé une morphologie typique d'hépatocytes pendant

toute cette période. Pourtant, des cellules transformées ont continué à se diviser en permanence, en se détachant de la couche de cellules étalées.

Ces cellules en suspension ont été récupérées à partir du milieu de culture, par une centrifugation à 65 g pendant 10 mn et ont été ensuite réensemencées dans des flacons neufs, dans le même milieu. Dans ces conditions, elles se sont attachées et ont proliféré. La viabilité cellulaire, estimée par l'exclusion du bleu trypane a été supérieure à 95%. Au 17<sup>ème</sup> jour après la mise en culture, les cultures du milieu de culture usagé provenant de dix flacons ont été rassemblées, soit environ  $5.10^6$  cellules, pour être ensemencées, en suspension, sans l'aide de microsupports sphériques, dans un biogénérateur, dans un volume final de 200 ml du même milieu de culture. Elles ont maintenu leur prolifération en suspension. Parallèlement, une plaque de culture contenant 24 puits de culture de 2 cm<sup>2</sup> a été ensemencée à raison d'environ 10 cellules par puits. Le milieu de culture du biogénérateur a été changé tous les trois jours, celui des flacons et de la plaque de 24 puits tous les deux jours. Après six jours de culture, le nombre de cellules dans le biogénérateur a été évalué à  $21.10^7$  cellules, ce qui correspond à une croissance 5,4 générations cellulaires. Le temps de doublement de la population cellulaire a donc été de 27 heures. Dans les flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> ces paramètres ont pu être estimés à 4,7 générations en cinq jours, correspondant à un temps de doublement de la population cellulaire de 26 heures, donc très comparable à celui des cellules cultivées en suspension.

### 3.2 Sécrétion d'hGH et sélection par la généticine:

Les cellules cultivées dans la plaque de culture de 24 puits ont subi un choc hyperthermique de 43°C pendant 3 h. L'hGH a été dosée par RIA dans chaque milieu de culture recueilli 24 h plus tard. Dans 3 des 24 puits, l'hGH a été produite aux taux respectifs de 5, 8 et 20 ng/10<sup>6</sup> cellules/24 h. Les cellules de la population la plus productrice ont été repiquées et ensemencées dans 24 autres puits. Un nouveau choc hyperthermique a été pratiqué 8 jours plus tard. L'hGH a été retrouvée dans 4 des 24 milieux recueillis, à raison de 3, 5, 9 et 31 ng/10<sup>6</sup> cellules/24 h.



### 3.3 Sécrétion d'albumine et de transferrine de rat:

Les cellules recombinées, cultivées dans un flacon, ont exprimé ces deux protéines endogènes pendant une période s'étendant au-delà de 75 jours de culture à des taux proches, voire supérieurs, à ceux des hépatocytes fraîchement isolés, à savoir entre 15 et 26  $\mu\text{g}/10^6$  cellules/24 h pour l'albumine et autour de 1,1  $\mu\text{g}/10^6$  cellules/24 h pour la transferrine.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau I qui suit.

**TABLEAU I**

SECRETION D'ALBUMINE ET DE TRANSFERRINE PAR DES HEPATOCYTES  
DE RAT TRANSFORMES IN VIVO PAR CO-TRANSFECTION AVEC LES  
PLASMIDES pEJ ET p17hGHneo ET CULTIVES EN FLACONS DE 75 cm<sup>2</sup>.

Age de la culture (jours)	64	76	80
Sécrétion d'albumine ( $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24 h)	15	26	15
Sécrétion de transferrine ( $\mu\text{g}/10^6$ cellules/24 h)	0,75	1,27	1,25

### 3.4 Biosynthèse des acides biliaires primaires du foie de rat:

La production d'acides biliaires par les cellules cultivées en biogénérateur 70 jours après la mise en culture a été mesurée par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (Tsaconas et al., 1986, Anal. Biochem. 157, 300-315). Les acides biliaires libres ont été séparés des conjugués par chromatographie en couche mince. Les acides biliaires qui ont été identifiés étaient l'acide chénodésoxycholique (CDC) et l'acide cholique (CH). Ce sont les deux acides biliaires primaires majeurs du foie de rat.

Les taux de production ont été:

- fraction libre: CDC: 1,7 nmol/mg de protéine cellulaire/24 h et CH: 3,5

nmol/mg de protéine cellulaire/24 h. Le rapport CDC/(CH + CDC) est égal à 33%, proportion observée normalement dans la sécrétion hépatique de ces acides biliaires primaires:

- fraction conjuguée: CDC: 2,6 nmol/mg de protéine cellulaire/24 h et CH: 5,2 nmol/mg de protéine cellulaire/24 h.

Par rapport aux taux de production in vivo des acides biliaires primaires libres et conjugués, cette sécrétion qui correspond à 13.1 nmol/mg de protéine cellulaire/24 h représente environ 1,5 à 2 fois celle du foie normal. Pourtant il faut noter que, dans l'organe, les hépatocytes constituent 90% du foie et que ce sont surtout les hépatocytes de la zone externe du globule hépatique qui synthétisent les acides biliaires, alors que vraisemblablement toutes les cellules recombinaées sont responsables de cette biosynthèse. D'autre part, la fraction analysée des stéroïdes biliaires contenait, dans la limite des valeurs normales, des stérols biliaires neutres de type hydroxycholestérols et cétocholestérols, ainsi que d'autres acides biliaires dihydroxylés et trihydroxylés qui accompagnent normalement la sécrétion de l'acide chénodésoxycholique et de l'acide cholique.

Cet exemple démontre que des hépatocytes peuvent être transfectés in vivo, in situ dans le foie, par deux plasmides, chacun encapsulé dans des liposomes. L'un, le pEJ, vecteur de l'oncogène cellulaire ras de Harvey muté et l'autre le p17hGHneo, vecteur du gène d'expression de l'hormone de croissance humaine et du gène de sélection par résistance à la néomycine, afin d'obtenir ensuite par explantation de la glande hépatique des hépatocytes capables de proliférer en culture et d'exprimer le gène recombiné, codant pour la synthèse de la protéine d'intérêt thérapeutique.

Les hépatocytes transfectés in vivo par les plasmides pEJ et p17hGHneo, encapsulés dans des liposomes, injectés dans la veine caudale et mis en culture, sont donc capables de proliférer in vitro. Ils gardent des fonctions spécifiques du foie, bien au-delà de deux mois de culture. Une partie de ces hépatocytes, non clonés pour cette activité, sécrètent l'hormone de croissance humaine dans le milieu de culture.

Les résultats de ces travaux de transfection in vivo démontrent la réalité du transfert du matériel génétique du plasmide encapsulé dans des

liposomes lorsqu'il est véhiculé sous cette forme par le sang veineux vers les cellules hépatiques de l'animal intact, et finalement capté. La recombinaison d'un gène oncogénétique permet d'obtenir des hépatocytes différenciés qui prolifèrent en culture, tout en exprimant des fonctions spécifiques du foie: biosynthèse d'albumine, de transferrine et des acides biliaires libres et conjugués, métabolisme des composés endogènes et métabolisme des xénobiotiques, impliquant l'activité des mono-oxygénases à cytochromes P-450. Comparativement, les hépatocytes de rats normaux, donc de rats non traités, ne sont maintenus en culture que quelques jours, perdant vite ces fonctions avant de se lyser, comme cela est bien connu.

Le clonage des hépatocytes rendus prolifératifs devrait permettre d'obtenir des lignées d'hépatocytes transformés qui garderaient un haut niveau d'activité hépatique fondamentale, permettant ainsi d'étudier le métabolisme des composés endogènes venant des autres tissus et de composés xénobiotiques produits par la chimie industrielle et la pharmacie. En même temps, ce modèle constitue un outil de grand intérêt pour des travaux sur l'expression de gènes oncogènes et de gènes codant pour la biosynthèse de protéines, pour une production industrielle.

### Exemple 2

On a réalisé de la manière décrite ci-dessous l'expression chez le rat de l'hormone de croissance humaine résultant de la transfection in vivo.

#### 1. Vecteur d'expression:

Les plasmides utilisés sont les plasmides p17hGHneo et p17HBN qui contiennent tous les deux le gène hybride hsp70-hGH (Dreano et al., 1988, Bio/Technology 6, 953-958).

#### 2. Transfection:

2.1) Des liposomes monolamellaires ont été préparés selon la méthode de Deamer et al., 1976, Biochem. Biophys. Acta 433, 629-634, à partir de 2 mg de phosphatidylcholine dissous dans 1 ml de chloroforme et repris, après évaporation, dans 1 ml d'éther diéthylique. Les suspensions finales de liposomes sont réalisées dans 1 ml de milieu de culture synthétique de base complet mais sans sérum, contenant soit 100 µg d'ADN de plasmide

p17HBN soit 100 µg d'ADN de plasmide p17hGHneo soit pas d'ADN. Ces solutions sont débarrassées de l'éther diéthylique par un bullage d'air-CO<sub>2</sub> (95:5, v/v), à 20°C, tout en équilibrant le milieu au pH physiologique par un système tampon, en vue de l'injection.

2.2 Chaque suspension de liposomes (encapsulant les plasmides) a été injectée dans la veine caudale d'un rat Fisher F-344 de huit semaines, à raison de 1 ml en 30 secondes.

2.3 Cette injection est répétée deux fois, à huit jours d'intervalle, (ou autant de fois et selon un rythme reconnu comme nécessaire pour observer une transfection de cellules des organes concernés.

2.4 1, 2 et 7 jours après l'injection, les animaux ont été soumis à un stress thermique par élévation de la température ambiante à 45°C pendant 20 mn. 1 jour après chaque induction thermique, 1 ml de sang de chaque rat a été prélevé et centrifugé immédiatement pour recueillir le plasma.

2.5 L'hGH a été dosée par radioimmuno-essai (radioimmunoassay, RIA) dans le plasma des trois rats (voir le Tableau II qui suit).

Dans les analyses du sérum de l'animal injecté avec les liposomes vides, un faible signal a été observé, probablement dû à une réaction non spécifique entre l'hormone de croissance de rat et les anticorps anti-hGH du RIA.

Les échantillons de plasma des rats injectés avec des liposomes encapsulant les plasmides p17HBN ou p17hGHneo contenaient entre 4 et 6 fois plus de GH que ceux du rat témoin. Les rats ont bien synthétisé de l'hGH après l'injection des liposomes encapsulant l'un ou l'autre des plasmides vecteurs du gène de l'hGH.

Le dosage de l'hGH sécrétée dans le sang de l'animal transfecté a été réalisé soit par dosage radio-immunologique (Trousse hGH-RIA, Pasteur Diagnostics, F-92430 Marnes-la-Coquette), soit par dosage immuno-enzymatique ELISA sur des supports sphériques (Trousse Sensibead EIA, Terumo Medical Corp., Elkton, MD 21921).

**TABLEAU II**  
**EXPRESSION IN VIVO CHEZ LE RAT DE L'hGH APRES INJECTION DE**  
**LIPOSOMES CONTENANT SOIT LE p17HBN, SOIT LE p17hGHneo.**

Rat no.	Plasmide injecté	Prélèvement du sang jours après l'injection	ng GH/ml de plasma
1	néant	2	0,3
		8	0,4
		20	0,0
2	p17HBN	2	1,6
		8	1,4
		20	1,1
3	p17hGHneo	2	2,6
		8	2,2
		20	1,6

### Exemple 3

On a réalisé de la manière décrite ci-dessous l'expression chez le rat d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance humaine résultant de la transfection in vivo suivante.

Deux rats Fisher F-344 de 10 semaines ont reçu, le premier, le vingtième et le vingt-septième jour de l'expérience, une injection intracardiaque de liposomes préparés selon l'exemple 1, encapsulant le plasmide p17HBN ou p17hGHneo. Les animaux ont été soumis à un stress thermique de 20 mn à 45°C tous les 3 à 5 jours après la première injection. Le sang de chaque animal a été prélevé au trentième jour de l'expérience et a été utilisé pour préparer le sérum.

Dans le même temps, des cellules de la lignée 6, obtenue par

transfection de cellules NIH-3T3 avec des plasmides contenant l'oncogène *c-ras* et le gène de l'hGH sous contrôle du promoteur du gène de la *hsp70* humaine (Dreano et al., 1986, *Gene* 49, 1-8), ont été incubées à 43°C pendant 2 heures, puis 24 heures à 37°C en présence de [35S]-méthionine.

Les surnageants de culture de ces cellules (0,5 ml) ont été utilisés pour détecter la présence d'anticorps anti-hGH par la technique d'immunoprécipitation. Brièvement, ils ont été incubés à 4°C pendant 3 heures soit avec des sérums des rats injectés avec les liposomes encapsulant p17hGHneo ou p17HBN soit avec un sérum de rat non traité soit avec un sérum de lapin hyperimmunisé contre l'hGH (DAKO). Les mélanges réactionnels ont ensuite été mis en présence de protéine-A-sépharose pendant 20 heures à 4°C. Après centrifugation, les complexes immuns liés à la protéine A des billes de sépharose (billes) ont été lavés trois fois avec un tampon NET-NP40, (100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 7.5, 0.5 % NP40) et deux fois avec un tampon RIPA-urée (1M urée, 1% Deoxycholate de Na, 1% de NP40, 0.05 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.02 M EDTA). Les billes ont été enfin remises en suspension dans 50 µl de "sample buffer" (50 mM Tris HCl pH 6.8, 1% SDS, 10% Glycérol, 0.005% Bleu de Bromophénol, 1.4 M 2-mercaptoéthanol) puis portées à ébullition pendant 2 mn à 100°C. Les surnageants ont été analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 15%-SDS (Laemmli, 1970, *Nature* 227, 680-685).

Les résultats de la Figure 1 montrent une protéine du poids moléculaire de l'hGH (22kd, indiquée par une flèche sans queue) dont la taille a été calculée par comparaison avec la position de protéines de poids moléculaire connu dont la position est indiquée par une flèche à gauche de la figure). L'hGH radioactive ainsi détectée, a été immunoprécipitée par les sérums des animaux injectés avec les liposomes encapsulant aussi bien le plasmide p17HBN (1) que p17hGHneo (2), et cela de façon comparable à l'hGH immunoprécipitée par le sérum de lapin commercial (+). Cette protéine est absente de l'échantillon analysé avec le sérum du rat non traité (-).

#### Exemple 4

On a réalisé de la manière décrite ci-dessous l'expression chez le lapin d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance humaine résultant de la transfection *in vivo*.

Trois lapins New Zealand (K.f.m., Switzerland) de 8 à 10 semaines ont reçu des injections de liposomes, préparés selon l'exemple 2, encapsulant le plasmide p17hGHneo dans la veine de l'oreille. Les animaux ont subi un stress thermique, par élévation de la température ambiante à 43°C pendant 30 mn, deux et sept jours après injection. Le même protocole expérimental a été répété 1 nouvelle fois six mois plus tard. Quelques ml de sang de chaque animal ont alors été prélevés et ont été utilisés pour préparer les sérums.

Les sérums ont été analysés selon la technique décrite dans l'exemple 3 et comparés au sérum d'un lapin non traité et au sérum d'un lapin hyperimmunisé contre l'hGH (DAKO).

Les résultats, présentés dans la Figure 2, montrent une bande correspondant à un poids moléculaire d'environ 22 kd (poids moléculaire de l'hGH, indiquée par une flèche sans queue) dans les échantillons contenant soit le sérum commercial (+) soit les sérums des 3 lapins injectés avec les liposomes encapsulant le plasmide p17hGHneo (1, 2, 3). Cette bande est absente dans l'échantillon contenant du sérum du lapin non traité (-).

Comme il ressort des exemples ci-dessus, le transfert d'un ADN de plasmide au moyen de liposomes injectés *in vivo* chez un animal, notamment le rat et le lapin, a permis de faire exprimer le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH). Cette hGH a été retrouvée dans le sang d'un rat ainsi traité, sécrétée jusqu'au dernier prélèvement effectué, 20 jours après la transfection. Par la suite, les résultats des exemples 3 et 4 montrent la présence d'anticorps anti-hGH dans le sérum rats ou des lapins injectés avec les liposomes encapsulant p17hGHneo ou p17HBN confirmant ainsi, que cette technique permet la synthèse *in vivo* d'une protéine codée par un ADN hétérologue injecté dans des liposomes et que la réponse immunitaire de l'animal peut être stimulée sans injection de l'antigène. De plus, la mise en évidence d'anticorps anti-hGH aussi bien dans le sang

circulant de rats que de lapins "transfectés" démontre de manière formelle l'expression du gène de l'hGH par les animaux "transfectés".

Il va de soi que le procédé selon l'invention permet d'obtenir des animaux hyperimmunisés pouvant être utilisés par la suite comme source de matériel biologique pour la production d'anticorps monoclonaux.

Après la mise en culture du foie du rat soumis à la transfection, les hépatocytes recombinants cultivés sécrétaient par ailleurs encore l'hGH 30 jours après la mise en culture, soit 50 jours après la transfection. La co-transfection des hépatocytes du rat ou de tout autre animal par un plasmide vecteur d'un gène de sélection et un plasmide vecteur d'un gène d'expression à intérêt biotechnologique est donc réalisable in vivo. Ce modèle permet d'obtenir des cellules hautement spécialisées, capables de proliférer in vivo, après explantation puis sélection en culture de cellules de l'organe de l'animal "transfecté". Dans le cas des hépatocytes, ces cellules recombinantes prolifératives expriment des fonctions hépatiques, en même temps que le gène recombiné.

#### Possibilité d'application industrielle

Le procédé d'expression par transfection in vivo selon l'invention, présente un grand intérêt pour produire des cellules différenciées capables de proliférer in vitro présentant des applications industrielles entre autres dans les domaines de la pharmacologie, de la toxicologie et de la cancérogénèse. D'autre part, elle permet d'insérer ou de réinsérer in vivo un gène non exprimé débouchant sur la synthèse in vivo de protéines hétérologues biologiquement actives ou antigéniques. Cette dernière application permet soit de vacciner des animaux soit de les utiliser pour la production d'anticorps.



### Revendications

1. Procédé d'expression génétique de protéines hétérologues par des cellules transfectées in vivo à l'aide d'au moins un vecteur d'expression d'un gène encapsulé dans des liposomes, selon lequel on prépare une suspension de liposomes dans lesquels le vecteur d'expression est encapsulé et l'on injecte cette suspension de liposomes dans le sang circulant d'un animal, caractérisé par le fait que:

a) l'on injecte dans l'animal une suspension de liposomes encapsulant au moins un vecteur d'expression contenant un gène codant pour un oncogène, de manière que des cellules différenciées de l'animal, ainsi transfectées, puissent produire l'oncogène,

b) l'on prélève de l'animal un organe contenant les cellules transfectées qui expriment l'oncogène, et

c) l'on remet les cellules de l'organe prélevé en culture in vitro de manière à obtenir des cellules qui expriment l'oncogène et qui sont capables de proliférer in vitro.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on injecte une suspension de liposomes encapsulant en outre un vecteur d'expression contenant un gène codant pour une autre protéine désirée, de manière à pouvoir obtenir lesdites cellules qui expriment l'oncogène ainsi que l'autre protéine.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que ledit vecteur d'expression contient un gène codant pour un oncogène cellulaire.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que ledit vecteur d'expression contient le gène de l'ongène c-ras de Harvey.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que lesdites cellules différenciées transfectées sont des hépatocytes.

6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le gène codant pour ladite protéine désirée est le gène de l'hormone de croissance humaine.

7. Procédé d'expression génétique de protéines hétérologues par des cellules transfectées in vivo à l'aide d'au moins un vecteur d'expression de gènes encapsulé dans des liposomes, selon lequel on prépare une suspension de liposome dans lesquels les vecteurs d'expression sont encapsulés et l'on injecte cette suspension de liposomes dans un animal, caractérisé par le fait que:

a) l'on injecte dans l'animal une suspension de liposomes encapsulant un vecteur d'expression contenant un gène codant pour la protéine d'intérêt sous contrôle d'un promoteur du gène de protéine de choc thermique, de manière que les cellules transfectées de l'animal puissent produire in vivo la protéine d'intérêt,

b) l'on soumet l'animal à un choc thermique de manière à favoriser l'expression des gènes sous contrôle dudit promoteur de gène,

c) l'on prélève du sang circulant de l'animal des protéines d'intérêt ou des anticorps dirigés contre cette protéine, et

d) l'on répète ces opérations d'injection (a), de choc thermique (b) et de prélèvement (c) le nombre de fois nécessaire pour obtenir une synthèse adéquate de la protéine ou des anticorps.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que le gène codant pour ladite protéine désirée est le gène de l'hormone de croissance humaine.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que ledit promoteur du gène de protéine de choc thermique, est celui d'une protéine humaine de poids moléculaire de 70 kd.

10. Procédé selon la revendication 1 ou 7, caractérisé par le fait que l'on encapsule ledit vecteur d'expression dans des liposomes neutres monolamellaires.

11. Procédé selon la revendication 1 ou 7, caractérisé par le fait que l'on injecte ladite suspension de liposomes dans un rat ou dans un lapin.

12. Procédé selon la revendication 1 ou 7, caractérisé par le fait que le vecteur utilisé est un plasmide.

13. Procédé selon la revendication 1 ou 7, caractérisé par le fait que par l'intermédiaire du ou des vecteurs injectés, on transfecte les cellules soit par

un ou plusieurs gènes d'expression et par un ou plusieurs gènes de sélection, soit par un ou plusieurs gènes de sélection.

14. Protéine hétérologue telle que produite in vitro ou in vivo par des cellules transfectées selon les revendications 1 ou 7.

15. Cellules capables de proliférer in vitro, résultant de la transfection in vivo, par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1.

16. Cellules selon la revendication 15, caractérisées par le fait qu'il s'agit d'hépatocytes.

17. Anticorps, dirigés contre la protéine exprimée in vivo par les cellules transfectées par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 7.

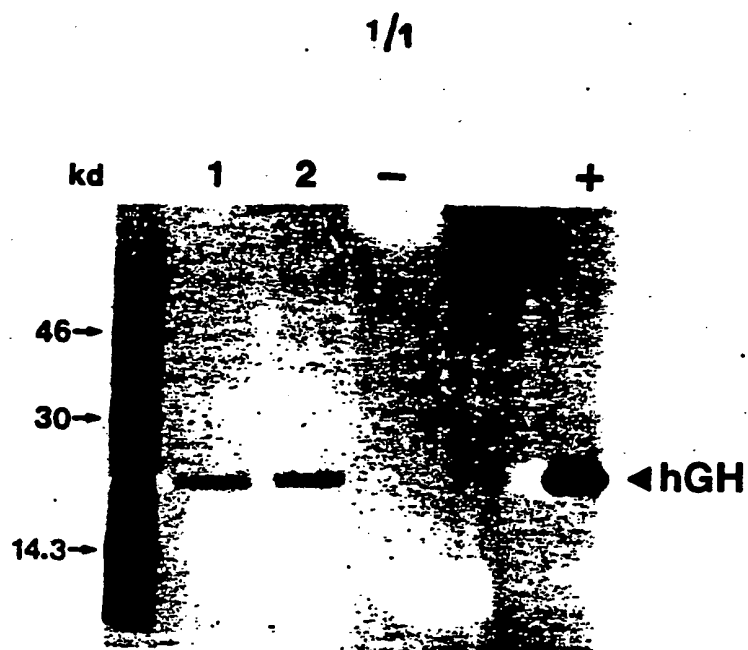


Fig. 1

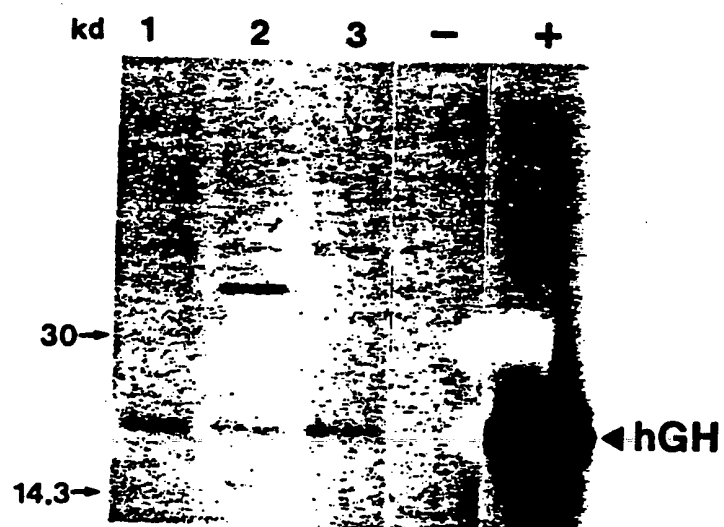


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CH 89/00141

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. <sup>5</sup> C 12 N 15/00, A 61 K 39/395						
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. <sup>5</sup></td> <td style="padding: 5px;">C 12 N 15/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 N 15/00
Classification System	Classification Symbols					
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 N 15/00					
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>						
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>				
P, X	Bio/technology, vol. 6, August 1988, (New York, US), M. Dreano et al.: "Production of secretable proteins using the passage in vivo as tumours of cells carrying heat-inducible expression constructs", pages 953-958 see the whole document (cited in the application)	1-17				
P, X	Bio/Technology, vol. 6, November 1988, (New York, US), M. Dreano et al.: "Antibody formation against heat-induced gene products expressed in animals", pages 1340-1343 see the whole document	1-17				
P, X	BioTechniques, vol. 6, No. 7, 1988, (Natick, Mass., US), R.J. Mannino et al.: "Liposome mediated gene transfer", pages 682-689 see abstract; pages 686-689; figs. 2-3	1, 15-16				
P, A		5, 7, 10-12				
Y	EP, A, 0027662 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.) 29 April 1981 see the whole document (cited in the application).	1, 7				
A		14-17				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>						
<b>IV. CERTIFICATION</b>						
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report				
11 September 1989 (11.09.89)		27 October 1989 (27.10.89)				
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer				
EUROPEAN PATENT OFFICE						

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	WO, A, 88/02778 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE). 21 April 1988 see the whole document	1,7
A		2-4,9,11-15
A	EP, A, 0235113 (SMITHKLINE BECKMAN CORP.) 2 September 1987 see page 2, lines 15-25; page 4, lines 3-16; page 7, lines 2-10; page 14, lines 6-12; page 18, line 23 - page 19, line 29; claims	1-6,12-15
A	US, A, 4394448 (F.C. SZOKA Jr. et al.) 19 July 1983 see abstract; page 3, column 6, example 4 (cited in the application)	1,7
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 261, No. 35, 15 December 1986, The American Society of Biological Chemists, Inc., (Baltimore, US) P.K. Nandi et al.: "Biologically active, recombinant DNA in Clathrin-coated vesicles isolated from rat livers after in vivo injection of liposome-encapsulated DNA", pages 16722-16726 see the whole document (cited in the application)	1,5,7,10-16
A	Science, vol. 215, 8 January 1982, AAAS, (Washington, US), M. Schaefer-Ridder et al.: "Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene", pages 166-168 see the whole document	1,7
A	Pascal Database, vol. 14, No. 3/4, 1985, abstract No. 86-X-0061520; C. Nicolau: "Liposomes for gene transfer and expression in vivo", pages 325-337 see abstract	7,10-16

Demande internationale N° PCT/CH 89/00141

<div> <div>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</div> <div>(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)</div> </div>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	<p>Science, vol. 215, 8 janvier 1982, AAAS, (Washington, US),  M. Schaefer-Ridder et al.: "Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene", pages 166-168  voir l'article en entier</p>	1,7
A	<p>Pascal Database, vol. 14, no. 3/4, 1985, résumé no. 86-X-0061520;  C. Nicolau: "Liposomes for gene transfer and expression in vivo", pages 325-337  voir résumé</p> <p>-----</p>	7,10-16

Demande internationale N° PCT/CH 89/00141

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
P, A	pages 682-689 voir résumé; page 686-689; figures 2-3	5,7,10-12
Y	EP, A, 0027662 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.) 29 avril 1981 voir le document en entier cité dans la demande	1,7
A	--	14-17
Y	WO, A, 88/02778 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 21 avril 1988 voir le document en entier	1,7
A	--	2-4,9, 11-15
A	EP, A, 0235113 (SMITHKLINE BECKMAN CORP.) 2 septembre 1987 voir page 2, lignes 15-25; page 4, lignes 3-16; page 7, lignes 2-10; page 14, lignes 6-12; page 18, ligne 23 - page 19, ligne 29; revendications	1-6,12-15
A	US, A, 4394448 (F.C. SZOKA Jr. et al.) 19 juillet 1983 voir résumé; page 3, colonne 6, exemple 4 cité dans la demande	1,7
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 261, no. 35, 15 décembre 1986, The American Society of Biological Chemists, Inc., (Baltimore, US), P.K. Nandi et al.: "Biologically active, recombinant DNA in Clathrin-coated vesicles isolated from rat livers after in vivo injection of liposome-encapsulated DNA", pages 16722-16726 voir l'article en entier cité dans la demande	1,5,7, 10-16
	--	
	./.	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/CH 89/00141

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) *		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <b>CIB<sup>5</sup>: C 12 N 15/00, A 61 K 39/395</b>		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée *		
Système de classification	Symboles de classification	
<b>CIB<sup>5</sup></b>	<b>C 12 N 15/00</b>	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> **		
Catégorie *	Identification des documents cités, ** avec indication, si nécessaire, des passages pertinents **	N° des revendications visées **
P,X	Bio/Technology, vol. 6, août 1988, (New York, US), M. Dreano et al.: "Production of secretable proteins using the passage in vivo as tumours of cells carrying heat-inducible expression constructs", pages 953-958 voir l'article en entier cité dans la demande	1-17
P,X	Bio/Technology, vol. 6, novembre 1988, (New York, US), M. Dreano et al.: "Antibody formation against heat-induced gene products expressed in animals", pages 1340-1343 voir l'article en entier	1-17
P,X	BioTechniques, vol. 6, no. 7, 1988, (Natick, Mass., US), R.J. Mannino et al.: "Liposome mediated gene transfer", ./..	1,15-16
* Catégories spéciales de documents cités: ** « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention « X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. « & » document qui fait partie de la même famille de brevets		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <b>11 septembre 1989</b>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <b>27. 11. 89</b>	
Administration chargée de la recherche internationale <b>OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</b>	Signature du <del>responsable</del> <b>responsable</b> <div style="text-align: right; font-family: cursive;">T.K. WILLIS</div>	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

CH 8900141  
SA 30083

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 20/10/89. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0027662	29-04-81	DE-A- 2942780	21-05-81
		CA-A- 1169793	26-06-84
		WO-A- 8101153	30-04-81
WO-A- 8802778	21-04-88	EP-A- 0263908	20-04-88
		AU-A- 8078487	06-05-88
		EP-A- 0285642	12-10-88
		JP-T- 1501439	25-05-89
		ZA-A- 8707656	18-04-88
EP-A- 0235113	02-09-87	AU-A- 6926487	03-09-87
		JP-A- 62265982	18-11-87
US-A- 4394448	19-07-83	US-A- 4235871	25-11-80
		BE-A- 874408	23-08-79
		DE-A- 2907303	06-09-79
		EP-A, B 0004223	19-09-79
		FR-A, B 2418023	21-09-79
		GB-A, B 2015464	12-09-79
		US-A- 4394149	19-07-83

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

CH 8900141  
SA 30083

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 20/10/89  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0027662	29-04-81	DE-A- 2942780	21-05-81
		CA-A- 1169793	26-06-84
		WO-A- 8101153	30-04-81
WO-A- 8802778	21-04-88	EP-A- 0263908	20-04-88
		AU-A- 8078487	06-05-88
		EP-A- 0285642	12-10-88
		JP-T- 1501439	25-05-89
		ZA-A- 8707656	18-04-88
EP-A- 0235113	02-09-87	AU-A- 6926487	03-09-87
		JP-A- 62265982	18-11-87
US-A- 4394448	19-07-83	US-A- 4235871	25-11-80
		BE-A- 874408	23-08-79
		DE-A- 2907303	06-09-79
		EP-A, B 0004223	19-09-79
		FR-A, B 2418023	21-09-79
		GB-A, B 2015464	12-09-79
		US-A- 4394149	19-07-83

EPD FORM 0002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**